

## MORFO-ANATOMIA DE LA ECTOMICORRIZA *CENOCOCCUM GEOPHILUM* FR. EN *NOTHOFAGUS ALESSANDRII* ESP.

### MORPHOLOGY AND ANATOMY OF THE ECTOMYCORRHIZA *CENOCOCCUM GEOPHILUM* FR. ON *NOTHOFAGUS ALESSANDRII* ESP.

Raúl Flores\*, Roberto Godoy\* y Götz Palfner\*\*

#### RESUMEN

Se describe la morfo-anatomía del hongo ectomicorrízico de amplia distribución, *Cenococcum geophilum* Fr. en plántulas de *Nothofagus alessandrii* Esp., cultivadas en condiciones experimentales de laboratorio. Ilustraciones y fotografías del hábito, estructura del manto, hifas radiantes y secciones transversales y longitudinales de la ectomicorriza, permiten caracterizar la relación simbiótica. Se discute la importancia del presente estudio para la investigación básica y aplicada en *N. alessandrii*.

**PALABRAS CLAVES:** Ectomicorriza, simbiosis, *Cenococcum*, *Nothofagus*.

#### INTRODUCCION

El género *Nothofagus*, perteneciente al elemento florístico Austral-Templado, constituye por excelencia el taxon de mayor interés, desde una perspectiva evolutiva y biogeográfica (Klötzli 1983, Ramírez 1987, Hill 1992).

Los bosques de *Nothofagus alessandrii*, especie vulnerable y con una superficie que enfrenta una acelerada reducción, están representados exclusivamente por bosques de segundo crecimiento (San Martín *et al.* 1984, Donoso 1993). Uno de los aspectos de gran relevancia a considerar en manejo silvicultural y de restauración ecológica de áreas degradadas, es el estudio de la

#### SUMMARY

The widely distributed ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. which forms symbiosis with many tree genera, is described morpho-anatomically for the first time on seedlings of *Nothofagus alessandrii* Esp. grown in laboratory. Habit, cellular pattern of the fungal mantle and structure of the whole mycorrhiza in cross and longitudinal sections are comprehensively described and illustrated by means of optical and electron microscopy. The role of ectomycorrhizae within basic and applied investigations on *N. alessandrii* is discussed.

**KEYWORDS:** Ectomycorrhiza, symbiosis, *Cenococcum*, *Nothofagus*.

rizósfera, en particular las asociaciones micorrízicas (Flores 1996).

La importancia de la simbiosis micorrízica en ecosistemas naturales al nivel mundial ha sido extensamente documentada (Garrido 1988). Esta asociación simbiótica conlleva una serie de ventajas para el huésped, principalmente en lo referido a la absorción y transporte de nutrientes y agua, a través de una estrecha red de hifas bajo el suelo, permitiendo el traspaso de sustancia a nivel intra- e interespecífico (Finlay y Read 1986).

Estudios sobre descripciones de ectomicorrizas en Chile, son aportados por Garrido (1988), que incluye varias especies de *Nothofagus* y hospedantes arbóreos introducidos. Ultimamente Palfner & Godoy (1996) contribuyen con estudios de morfo-anatomía de ectomicorrizas en *N. pumilio*. Sin embargo, dada la imperiosa necesidad de contar con un catastro sobre el fenómeno micorrízico en especies nativas de Chile, se han iniciado el presente estudio, cuyo objetivo es, caracterizar la morfo-anatomía de la micorriza *Cenococcum*

\*Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

\*\*Institut für Systematische Botanik, Ludwig-Maximilians Universität München, Menzinger Str. 67, D-80638 München, Germany.

*geophilum* en *Nothofagus alessandrii*, cultivado en condiciones experimentales de laboratorio.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio fue realizado con suelo colectado en el bosque original de *Nothofagus alessandrii* Esp., proveniente de la Reserva Nacional los RUILLES (35°50' S y 72°30' W). El suelo se define del tipo pardo no calcáreo a lateritas pardo-rojizas, de carácter levemente ácido, con textura franco arcillosa. Antecedentes sobre las propiedades químicas del suelo son aportados por Flores (1996).

Mediante bioensayos de inoculación con propágulos del suelo original se desarrolló un ensayo de inoculación experimental de *Nothofagus alessandrii* en condiciones de laboratorio, según el esquema de Finlay y Read (1986). Transcurrido un período de 12 meses, el material radical fue obtenido de acuerdo a la metodología indicada en Agerer (1991).

Para efectos de la caracterización morfo-anatómica, el material fue observado en microscopio estereoscópico Leica Wild M-10, microscopio óptico Leitz Dialux 20, según metodología de Agerer (1991) y Palfner (1995). El estudio en microscopía Electrónica de Barrido fue desarrollado con el equipo NANOLAB 2000, de acuerdo al procedimiento indicado en Godoy (1989). Una caracterización del manto fúngico, mediante los test químicos, fue realizada de acuerdo a Agerer (1987-1995).

## RESULTADOS

Muestras de raíces finas de *Nothofagus alessandrii*, obtenidas del bioensayo en laboratorio, fueron analizadas microscópicamente, determinando la presencia de asociaciones micorrízicas diversas, junto a *Cenococcium geophilum*, que corresponde al tipo más frecuente en el sistema radical del hospedante. A continuación se describen los aspectos morfo-anatómicos de la micorriza.

**HABITO:** *C. geophilum* forma una ectomicorriza simple, ocasionalmente ramificada del tipo monopodial, corta, recta y de aspecto compacto. La longitud de la ectomicorriza, varía entre 2 - 8 mm, cuyo diámetro del eje principal oscila entre 0.4 - 1.0 mm. Las ramas laterales son de dimensiones de 3mm y 0.4mm, para longitud y diámetro, respectivamente. La ectomicorriza simple posee una longitud de 2-3 mm con diámetros de

0.3 - 0.4 mm. Presenta un color negro brillante y en los extremos distales posee tonalidades grises en su estado juvenil. La superficie del manto es homogénea. Las células corticales del hospedante no son visibles a través del manto. La superficie es lisa y cubierta con hifas radiantes, densas y con distribución uniforme. Las hifas radiantes se caracterizan por presentar forma recta, gruesas y de coloración negra (Fig. 1 a,b y Fig. 2 a). La ectomicorriza no presenta rizomorfas y en el material no se observan esclerocios.

**ANATOMIA DEL MANTO EN VISTA SUPERFICIAL:** La superficie del manto presenta una estructura plectenquímica con hifas estrechamente unidas y de aspecto compacto. Desde un centro definido en el manto se originan las hifas con una configuración de tipo radial, que se repite a distancias de 25 - 70  $\mu$ m (Fig. 1c y Fig. 2e).

Las hifas componentes del manto, de forma rectangular elongada, presentan una longitud de 10-20  $\mu$ m y diámetros de 5-6  $\mu$ m, cuyo grosor de la pared longitudinal es de 0.5 - 2.0  $\mu$ m. Los septos son delgados, ocasionalmente engrosados. A este nivel de detalle, el manto se observa de color café y de aspecto regular, plano. El manto presenta 2-6 estratos celulares. Las paredes celulares externas son de mayor grosor, de color más oscuro que en las capas más internas, delgadas y hialinas. Las capas externas presentan hifas rectangulares elongadas y de arreglo plectenquímico, mientras que las más internas presentan configuración menos compacta y con paredes celulares más delgadas, no evidenciando una distribución del tipo radial. Las características del ápice no revelan variación morfológica con respecto al total de la micorriza.

**HIFAS RADIANTES:** Se observan con frecuencia hifas que emergen desde el manto, denominadas como hifas radiantes (Fig. 2b,c). Presentan un color café claro a oscuro y con diámetros de 4-6  $\mu$ m. Estas hifas son rectas a ligeramente onduladas, poco ramificadas y ocasionalmente anastomosadas, con protuberancias y septos sin fíbulas. Los septos se suceden a distancias de 20-50  $\mu$ m, con grosores que alcanzan hasta 2  $\mu$ m (Fig. 1e, Fig. 2d, f).

El tipo de ramificación es bifurcada. La parte distal de las hifas radiantes es de forma redondeada, aguda o truncada (Fig. 1f, g). Ocasionalmente, desde el interior de los extremos distales se pro-

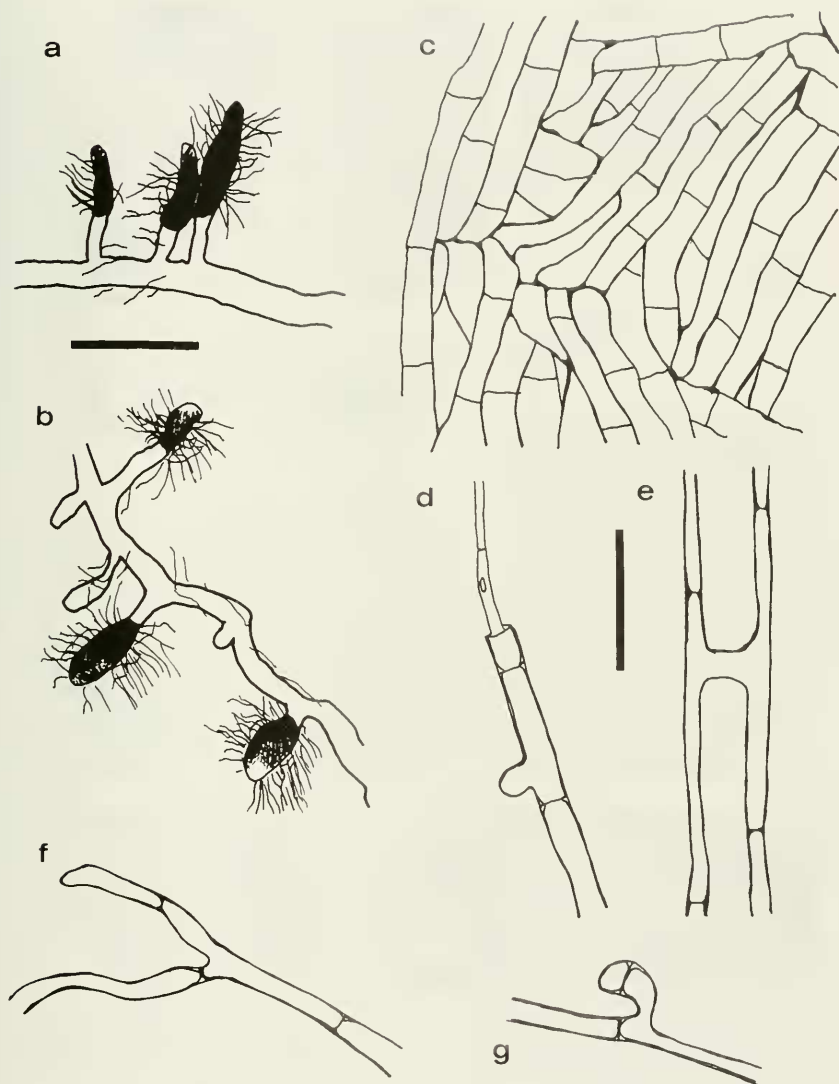


FIGURA 1. Morfo-anatomía de *Cenococcum geophilum*. a, b = Hábito de la ectomicorriza (escala = 6mm); c= Vista superficial del manto plectenquimático, d= Sección de hifa con formación de hifa intrahifal y protuberancia, e= Hifas con septos simples y presencia de anastomosis, f = Ramificación de una hifa y g= Hifa radiante en estadio inicial de ramificación (escala para c - g = 20 μm).

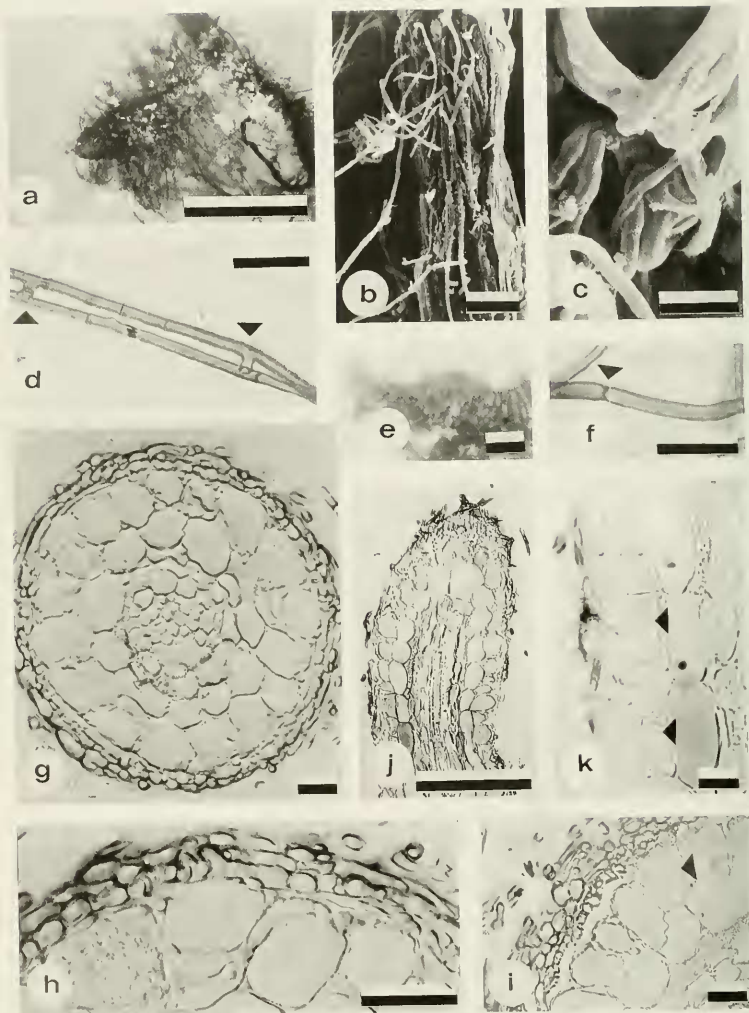


FIGURA 2. Micorriza de *Cenococcum geophilum*, a= Hábito de la ectomicorriza (M.S. escala= 5mm), b = Vista superficial de la ectomicorriza (M.E. , escala= 50 µm), c= Detalle de las hifas radiantes del manto (M.E., escala= 20 µm), d= Anastomosis en las hifas radiantes (M.O., escala = 20 µm), e=Vista superficial del manto plectenquimático (M.O., escala= 20 µm), f= Detalle de formación de septo en las hifas radiantes (M.O., escala = 20 µm) y g= Sección transversal por raíz donde se indica el manto, células corticales con red de Hartig y cilindro central (M.O., escala 20 µm), h= Detalle de sección transversal por la zona cortical de la raíz con un desarrollo de manto y red de Hartig (M.O., escala 20 µm), i= Sección transversal del manto con red de Hartig y lóbulos en vista superficial ("palmetti") (M.O., escala 20 µm), j= Sección longitudinal del ápice de la ectomicorriza, con presencia de manto y células corticales con red de Hartig y cilindro central (M.O., escala = 150 µm) y k= Detalle de zona cortical con vista longitudinal de la red de Hartig en primer plano ("palmetti") (M.O., escala 20 µm). M.S.= Microscopio estereoscópico, M.O. = Microscopio óptico, y M.E.=Microscopio electrónico de barrido.

longa una hifa hialina más delgada de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro y longitud de 4-6  $\mu\text{m}$ , constituyendo las denominadas hifas intrahifales (Fig. 1d).

**SECCION TRANSVERSAL:** El grosor del manto es de 10-30  $\mu\text{m}$ , constituido por 2 - 6 capas celulares, participando en igual número las capas externas e internas (Fig. 2g). Las células que conforman las capas externas son de mayor tamaño, de color café e isodiamétricas, cuyos diámetros oscilan entre 4-10  $\mu\text{m}$ , con un grosor de las paredes de 1 - 3  $\mu\text{m}$ . Las capas internas presentan diámetros menores de 1-4  $\mu\text{m}$ , cuyo grosor de la pared celular tiene de 0,5-2  $\mu\text{m}$ . Las células de coloración más clara presentan igualmente forma isodiamétrica (Fig. 2h).

La red de Hartig está constituida por pequeñas células ovaladas, de diámetros entre 2-4  $\mu\text{m}$ , cuyo grosor de la pared celular es de 0,5  $\mu\text{m}$ . La columna de hifas inserta entre las células corticales alcanza una profundidad de hasta 3-7 células hifales y éstas sólo penetran en forma perpendicular a la superficie del manto. Los valores obtenidos para la red de Hartig en sección transversal y longitudinal de la raíz son similares. Lóbulos de la red de Hartig en vista superficial son asimilables a los denominados "palmetti" (2i).

**SECCION LONGITUDINAL:** En el plano longitudinal, el grosor del manto es variable entre 10-30  $\mu\text{m}$  y el número de estratos celulares oscila entre 2 y 6. Las capas externas de color café oscuro, registran células con diámetros de 2-10  $\mu\text{m}$  y espesor de la pared celular de 1 - 3  $\mu\text{m}$ . Las capas internas presentaron diámetros de 1-5  $\mu\text{m}$ , con una pared de 0,5-2  $\mu\text{m}$ . Las células son de forma isodiamétrica y color café claro (Fig. 2j,k). Las características y dimensiones de la red de Hartig corresponden a las descripciones señaladas para la sección transversal. Las hifas penetran de forma paraepidermal entre las células corticales exteriores.

**TEST QUIMICO:** En las pruebas de reacciones químicas para el manto fúngico no se observó cambio de color o reacción frente a: Azul de algodón en ácido láctico, Solución Guaic, Reactivo Melzer, Sulfo Vanilina, Hidróxido de Potasio y Sulfato de Hierro.

## DISCUSION

*Cenococcium geophilum* constituye una especie de carácter cosmopolita, cuyas asociaciones micorrízicas han sido descritas con frecuencia para

bosques templados del Hemisferio Norte (Pigott 1982) e incluso bajo condiciones extremas de impacto antrópico (Gronbach 1988). Para Chile, la ectomicorriza de *C. geophilum* ha sido documentada por Garrido (1986), quien menciona registros con hospedantes arbóreos introducidos y nativos, destacando la baja especificidad del simbiote. Garrido (1988) registra la asociación de *C. geophilum* en 8 especies del género *Nothofagus* y entrega una caracterización parcial, basado en la síntesis micorrízica obtenida para *Eucalyptus globulus* Labill. y *Pinus radiata* D. Don.

En el presente estudio, *C. geophilum* coloniza tempranamente y corresponde a la micorriza más frecuente en el sistema radical de las plántulas de *N. alessandrii*. La obtención de la micorriza a través de propágulos del suelo original permitió la descripción detallada, cuyo hábito y coloración peculiar han sido descritos para diversos hospedantes arbóreos (Garrido 1988, Agerer 1987-1995). La estructura del manto observado es de características similares a lo indicado por Pigott (1982) y Gronbach (1988) y las pequeñas diferencias en las dimensiones del manto son atribuidas al estadio juvenil del desarrollo. Hifas radiantes es el nombre acuñado en la presente descripción, por no existir una denominación en la literatura especializada en español. Agerer (1987-1995, 1991) utiliza el nombre de "emanating hyphae" (hifas emanantes), término que no consideramos adecuado para la estructura en mención.

Por la importancia que presentan las asociaciones micorrízicas para las especies de *Nothofagus* de los bosques templados de Chile, un catastro actualizado con descripciones morfológicas contribuirá a explicar las relaciones ecofisiológicas y los mecanismos de reconocimiento entre los simbiositos. De este modo, la descripción morfo-anatómica de la ectomicorriza realizada por primera vez en *N. alessandrii* permite la correcta identificación de los organismos involucrados. El estudio contribuye a fortalecer investigaciones de carácter ecológico y su aplicación en programas de restauración ecológica mediante inoculación micorrízica controlada, condición necesaria en aquellas especies con problemas de conservación.

## AGRADECIMIENTOS

El estudio fue realizado a través del Proyecto Fondecyt 1940849 y Fondecyt 1970707. G. Palfner agradece la ayuda de Konrad-Adenauer-

Stiftung. Por el estímulo y colaboración en el estudio sobre ectomicorrizas, se agradece al Prof. Dr. R. Agerer. Las facilidades de microscopía otorgadas por el Dr. José Arenas e Ing. Ricardo Silva son tratamente valoradas.

### BIBLIOGRAFIA

- AGERER, R. 1987-1995. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Eduard Dietenberg, Germany.
- AGERER, R. 1991. Characterization of ectomycorrhizae. In: Read, D.J., Varma, A. y Norris, J.R. (eds.): Techniques for the study of mycorrhiza. Academic Press, London, Methods in Microbiology, 23: 25-73.
- DONOSO, C. 1993. Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 483 pp.
- FINLAY, R. AND READ, D. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. New Phytol., 103: 143-156.
- FLORES, R. 1996. Estudios básicos para la restauración de los bosques de ruil (*Nothofagus alessandrii* Esp.). Tesis Ingeniero Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, 78 pp.
- GARRIDO, N. 1986. Survey of ectomycorrhizal fungi associated with exotic forest tree in Chile. Nova Hedwigia, 43(3-4): 423-442.
- GARRIDO, N. 1988. Agaricales s.l. und ihre Mykorrhizen in den *Nothofagus* Wäldern Mittelchiles. Bibliotheca Mycologica, 120: 1-528.
- GODOY, R. 1989. Beeinflussung der Mykorrhiza von Repräsentanten der Krautschicht eines *Melicofagetum* durch gasförmige Immissionen. Verlag Tanja-Maraun, Germany, 120 pp.
- GRONBACH, E. 1988. Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen in einem Fichtenbestand mit Untersuchungen zur Merkmalsvariabilität in saurer beregneten Flächen. Bibliotheca Mycologica, 125: 1-217.
- HILL, R. 1992. *Nothofagus*: evolution from a Southern perspective. Tree, 7(6): 190-193.
- KLÖTZLI, F. 1983. Standortliche Grenzen von Fagaceen - ein Vergleich in beiden Hemisphären. Tuexenia, 3: 47-65.
- PALENER, G. 1995. Characterization and identification of some ectomycorrhizae on Oak (*Quercus robur* L.) in Slovenia. Proc. of BIOFOSP, Ljubljana, 191-194.
- PALENER, G. AND GODOY, R. 1996. "Nothofagiritza vinnicolor" + *Nothofagus puntillo* (Poepp. et Endl.) Krasser. Descriptions of ectomycorrhizae, 1: 65-70.
- PIGOTT, C. 1982. Fine structure of mycorrhiza formed by *Cenococcium geophilum* Fr. on *Tilia cordata* Mill. New Phytol., 92: 501-512.
- RAMIREZ, C. 1987. El género *Nothofagus* y su importancia en Chile. Bosque, 8(2): 71-73.
- SAN MARTIN, J., FIGUEROA, H. Y RAMIREZ, C. 1984. Fitosociología de los bosques de ruil (*Nothofagus alessandrii* Espinosa) en Chile Central. Revista Chilena de Historia Natural, 56: 171-199.

Fecha de publicación: 29 de abril de 1998.